Clinica Pediatrica della R. Università di Roma

SULLA TOSSICITÀ DEL BACILLO DI LOEFFLER

IN RAPPORTO ALLA SUA MORFOLOGIA

10.

PER

LUIGI Prof. CONCETTI
Direttore della Clinica.

GIOVANNI Dott. MEMMO
Assistente.

Estratto dagli *Annali d'Igiene sperimentale*. Volume VIII, Fascicolo I.

ROMA
Società Editrice Dante Alighieri
Via del Corso, Angolo del Caravita, n. 6.
1898

Estratto dagli *Annali d'Igiene sperimentale*. Volume VIII, Fascicolo I.

Clinica Pediatrica della R. Università di Roma

SULLA TOSSICITÀ DEL BACILLO DI LOEFFLER

IN RAPPORTO ALLA SUA MORFOLOGIA

PER

LUIGI Prof. CONCETTI
Direttore della Clinica.

GIOVANNI Dott. MEMMO
Assistente.

In una pubblicazione comparsa negli Annali dell'Istituto Pasteur nell'anno 1892, [1] il Martin distingueva tre varietà di bacilli difterici: una rappresentata da bacilli corti, più o meno uniformemente colorati, disposti per lo più parallelamente: una da bacilli grossi, lunghi, spesso terminati a clava con 2-3 punti intermedii scolorati, intrecciati variamente fra loro: ed una terza varietà di bacilli di media grandezza, quasi forma di passaggio dalla prima alla seconda. A queste tre varietà attribuiva inoltre un grado diverso di potere patogeno, nel senso che i bacilli corti fossero poco tossici, quelli mezzani lo fossero di più, mentre la massima virulenza apparterrebbe ai bacilli grossi, clavati. Queste affermazioni sono state accettate dalla maggior parte dei clinici di Francia, e non compare relazione di un esame batteriologico, senza che non vi si trovi specificata le morfologia del bacillo, e su questa non si regoli la prognosi, e quello che ci sembra grave, anche la indicazione terapeutica.

È cosi che, per non permetterci che due citazioni, Barbier diceva che: Seule l'existence du bacille long, enchévètré aurait eu une valeur réelle, au point de vue morphologique, du moins. E Chantemesse: Quand on nous parle du bacille diphtérique, il faut nous dire si ce bacille est long, s' il a la forme enchévètrée, et c'est alors seulement qu'on pourra admettre qu' il y a eu diphtérie. [2] E per quello che riguarda il criterio terapeutico vediamo che alcuni, presi da non sappiamo quali esagerati

---

[1] *Examen clinique et bactériologique de 200 enfants entrés au pavillon de la diphterie.*

[2] V. Grancher I. *Le diagnostic bactériologique et le diagnostic clinique de la diphtérie.* — Journal de clinique et thérap. infantile, 18 mars 1893, pag. 201 et suiv.

timori di possibili e fantastiche azioni nocive attribuite al siero antidifterico, sono giunti a stabilire come assioma che quando in un difterico l'esame batteriologico, limitato alla semplice osservazione microscopica, rivela la sola varietà di piccoli bacilli, si può e forse si deve fare a meno d'intervenire colla sieroterapia, la quale deve essere riservata solo a quei casi che presentano la varietà media e grossa del bacillo, segno di virulenza maggiore e perciò di maggiore gravezza. Ora abbiamo detto che tale deduzione ci sembra grave per le funeste conseguenze a cui può dar luogo, posto che tale ottimismo destato dalla presenza dei bacilli corti abbia poco fondamento.

Uno di noi già in altre pubblicazioni [1] in base ad osservazioni personali aveva sostenuto la non esattezza delle affermazioni di Martin, e credeva piuttosto che la forma lunga e grossa dei bacilli dipendesse o da una specialità del terreno di coltura, o rappresentasse forme vecchie vicine al periodo involutivo e di segmentazione. Infatti esse si trovano più spesso nelle colture vecchie e raramente in quelle recenti ove predominano i bacilli corti, trovati del resto anche questi il più delle volte virulentissimi.

Se qualche volta le colture vecchie contenenti in predominio i bacilli lunghi si sono mostrate più tossiche, affermavamo ciò potesse dipendere dal fatto che il brodo contenesse maggiore quantità di sostanza tossica proveniente non solo dalla vita dei bacilli, ma ancora dalla loro macerazione, perchè si sa che il protoplasma dei bacilli stessi anche morti è dotato di un alto potere tossico.

In seguito non sono mancate qua e là delle osservazioni tendenti ad infirmare le asserzioni di Martin. Così Sabatier trovò che se è vero che la presenza del bacillo corto è ordinariamente di un pronostico più favorevole, ciò non è la regola assoluta: si vedono casi gravi ed anche mortali in cui non esiste che il bacillo corto; e d'altra parte il bacillo lungo è stato riscontrato in casi di una rimarchevole benignità [2]. P. Simon cita due casi in cui l'esame batteriologico rilevò il bacillo lungo. Ora uno di questi casi coincideva con una forma di angina pultacea delle più benigne, mentre l'altro era dato da una angina difterica grave. Il bacillo lungo, clavato, ricavato dal primo caso, inoculato in una cavia alla dose di 1 c.c. di coltura pura di due giorni non dette luogo nep-

---

[1] Concetti. *Studi clinici e sperimentali sulla difterite.* — Roma, tip. Giov. Bertero, 1894, pag. 24-25.
— *La difterite.* Tratt. Ital. di Patol. e terap med. diretto dal prof. Maragliano. Vol. I, parte V, pag. 10-11.

[2] Thèse de Paris, 1896. Cit. da Simon; vedi appresso

pure ad un leggero edema locale. [1] Gougueneim [2] studiando la difterite negli adulti asserisce che il bacillo di Loeffler può essere lungo, medio e corto senza che questo aspetto abbia un significato dal punto di vista della natura benigna o grave dell'affezione.

Raccogliendo quelle nostre osservazioni ove è messa in rapporto la gravezza della forma clinica col reperto batteriologico, dal punto di vista della morfologia del bacillo, vediamo come la forma grave o mite della malattia non possa essere affatto giudicata in base alla grandezza od alla forma del bacillo medesimo. E quando parliamo di gravezza intendiamo di limitarci a quei casi seguìti da morte, essendo che gli altri criteri potrebbero essere troppo subbiettivi, e suscitare il dubbio che uno possa essere stato suggestionato dalla tesi che ha preso a sostenere. Sono in tutto 39 casi, di cui 25 seguìti da guarigione e 14 da morte, ossia in cui la mortalità è rappresentata da una percentuale di 35,89. Ora in questi 39 casi il reperto batteriologico microscopico, e la mortalità sono esposti nel seguente specchietto:

Forme bacillari	Totale	Guariti	Morti	Mortalità °/°
Forme piccole	14	9	5	35. 71
Id. medie	5	3	2	20. 00
Id. grosse	6	4	2	33. 33
Id. miste piccole e medie .	3	2	1	33. 33
Id. id. piccole e grandi .	3	3	0	00. 00
Id id. medie e grandi .	7	3	4	57. 14
Totale . . .	39	25	14	35. 89
Casi con presenza di forme grosse	16	10	6	37. 50

Come si vede, le forme esclusivamente piccole ci han dato una mortalità perfino superiore alle forme esclusivamente grandi, e di piu che

---

[1] P. Simon. *Du diagnostic des angines diphtériques.* Journ. de Clin. et thérap. infant., 25 fevr. 1897, pag. 145.

[2] Gougueneim. *Sur la diphtérie de l'adulte.* Soc. méd. des Hôpitaux, 29 janvier 1897. — Semaine médicale, 3 février 1897.

un terzo superiore alle forme esclusivamente medie: solo l'unione delle forme grandi alle medie avrebbe dato una mortalità superiore; mentre riunendo tutti i casi in cui si constatarono forme grandi, sia sole, sia unite alle piccole ed alle medie, la mortalità è stata presso a poco uguale a quella delle forme piccole ed a quella del totale delle osservazioni.

Nella casuistica dei 21 casi che sotto riportiamo e che hanno somministrato il materiale per i nostri esperimenti (v. tabella a pag. 18, 19 e 20), troviamo indicata 15 volte la forma clinica grave, seguita da guarigione in 7 casi e da morte negli altri 8. Ora in questi 15 casi risultava la forma bacillare piccola in 7, la media in 1, la grossa in 2, la forma mista piccola e media in 1, la forma mista media e grande in 4. Mentre in 4 casi in cui si ha la indicazione di forma clinica leggera, in 2 si ebbero forme bacillari piccole, ed in 2 grosse.

Però queste osservazioni cliniche così studiate non ci danno affatto un criterio sicuro per risolvere la questione se quella data forma bacillare abbia un grado di tossicità maggiore o minore di un'altra. La gravezza di ogni singolo caso di affezione difterica ed anche la sua letalità stanno in rapporto con un complesso di cause fra cui la virulenza e la tossicità del bacillo patogeno occupano forse il posto meno importante. Si sa infatti che il massimo peso deve darsi alla maggiore o minore resistenza locale e generale dell'organismo che lo alberga a risentirne i tristi effetti. Vi sono individui dotati di una massima resistenza locale e generale, che sono assolutamente immuni, ed in essi può trovarsi un bacillo dotato per gli animali, e per gli altri organismi umani del massimo potere patogeno, senza che nel caso speciale dia luogo alla minima manifestazione morbosa. Per l'opposto ve ne sono altri in cui i poteri di resistenza sono minimi, ed allora un bacillo dotato di un grado molto minore di virulenza e di tossicità può in essi produrre effetti gravissimi ed anche letali. Fra questi due estremi vi sono una quantità di modalità di resistenza sia locale delle mucose, sia generale, da dare la spiegazione delle varie manifestazioni morbose presentate dai vari individui esposti alla stessa causa di contagio. Di più vi sono le associazioni batteriche per cui alcuni altri microrganismi più o meno patogeni (streptococchi, stafilococchi, pneumococco, Friädlander, bacterium coli comune, ecc.), possono mescolarsi al bacillo difterico, e preso il sopravvento, determinare essi stessi la gravezza speciale e la morte, aiutati in ciò anche dallo stesso intossicamento difterico che, benchè sia leggero, pure diminuisce la resistenza dell'organismo di fronte ai detti batterii di associazione.

È per ciò che noi dopo aver riferito questi dati clinici, dando loro

soltanto il valore che possono avere, e giusto per contrapporli a quelli dei nostri colleghi di Francia, i quali senza curarsi di altre ricerche, han voluto dar loro un valore assoluto, abbiamo voluto studiare la quesione da un punto di vista piu esatto e diremo ancora più scientifico. Abbiamo cioè voluto vedere e misurare il grado di tossicità delle varie forme bacillari, estraendone la tossina e determinando il potere tossico della medesima sulle cavie che, come si sa, sono sensibilissime a tale genere di avvelenamento.

Il materiale è stato raccolto sempre dalla gola di bambini difterici. In qualche caso, fra quelli morti all' Ospedale, si è fatta una seconda raccolta all'autossia. Tenevamo sempre pronti a nostra disposizione dei tubi di vetro contenenti un asse di vetro o di legno portante alla sua estremità un tamponcino di ovatta bene fissato, ed il tutto naturalmente bene sterilizzato dapprima in stufa a secco. Nel momento che volevamo raccogliere il materiale, estraevamo l'asta dal tubo, e portavamo sulla parte malata il tamponcino di ovatta asportando muchi e brani di falso membrane, e la bacchettina veniva di poi immediatamente riposta nello stesso tubo sterilizzato che si portava senza perdita di tempo al laboratorio. Ivi si faceva subito un primo esame microscopico in preparati a secco, colorati con lo Zihel e col bleu di metilene per vedere la forma e la disposizione dei bacilli. Poi si stemperava l'ovatta in un altro tubo contenente brodo sterile, e da questo si facevano le colture a piatto in agar-agar glicerinato nelle capsule di Petri. Dopo 48 ore di sfusa a 37° si facevano molti preparati in goccia pendente ed altri a secco colorati, per stabilire con più precisione e con più sicurezza la forma bacillare e studiarne i caratteri morfologici, specialmente se le prime ricerche fossero state poco decisive. I risultati di queste due osservazioni erano sempre identici per ciò che concerne la forma, la grandezza e la disposizione dei bacilli.

Contemporaneamente colle colonie isolate dalle colture a piatto, si seminavano dei fiaschi contenenti ciascuno 500 c.c. di brodo sterile, neutro, preparato con carne di cavallo ucciso da 3 giorni. Questi fiaschi venivano posti nel termostato, al buio, ad una temperatura costante di 35°, e vi si lasciavano per 30 giorni. Al 30° giorno si esaminavano al microscopio in goccia pendente, ed in preparati colorati e si notavano le apparenze e le differenze rispetto alla morfologia.

Con delle colture a piatto in agar-agar ci rendevamo certi che la coltura non fosse stata inquinata, e facendo uso sempre di una stessa ansa di platino, si poteva, fino ad un certo punto, valutare approssimativamente il numero dei microrganismi. Assicurati di ciò, il liquido veniva filtrato attraverso lo Chamberland o conservato in tubi sterilizzati

fuori dell'azione della luce. Abbiamo avuto l'avvertenza di escludere per gli esperimenti i primi filtrati, e di cominciare solo ad utilizzare il liquido dal 5° tubo in poi, perchè secondo le ricerche di Dziergowski, i primi prodotti di filtrazione contengono un potere tossico meno elevato [1]. Gli animali scelti per l'esperimento, sono stati. come dicemmo, le cavie: la via di inoculazione, la sottocutanea; e come indicazione di potere tossico abbiamo ritenuto come dose minima mortale quella dose di tossina che entro i primi quattro giorni vale ad uccidere un grammo di peso dell'animale.

Questa dose, secondo i dettati di Behring, sarebbe espressa dalla formula + 1 M. Lasciamo la lettera M. che è l'abbreviazione di *Meerschweinchen* (cavia) per mantenere alla formula il carattere tipico originale che dovrebbe essere accettato universalmente nel linguaggio internazionale. Italianizzando la formula si dovrebbe scrivere + 1 C.

Il peso della cavia in grammi si esprime mettendo la cifra dei grammi come esponente (M^{250}). Secondo Behring l'unità di dose tossica minima mortale è data da quella tossina che alla dose di cc. 0,01 uccide in 4 giorni una cavia del peso di grammi 250, e questa combinazione è rappresentata dalla formula:

$$\text{cc. } 0{,}01\ DTN = + M.^{250}$$

la quale può essere espressa anche così:

$$1 \text{ ccm. } \frac{DTN}{100} = + 250 \text{ M.}$$

Questa tossina alla dose di un centimetro cubo ucciderebbe per conseguenza 100 cavie del peso di 250 grammi ciascuna:

$$1 \text{ ccm. } DTN = + 25000 \text{ M.}$$ [2]

Il numero dei casi in cui abbiamo fatto le nostre ricerche è stato di 21, offertici da bambini i quali presentavano localizzazioni o faringee a laringee od ambedue contemporaneamente. In qualche caso la presa del materiale è stata fatta due volte, e qualche volta anche sul cadavere.

Ecco il dettaglio delle nostre esperienze:

Caso I. (13 gennaio 1896). Gra. A., di anni 4. Forma clinica discretamente grave. Localizzazione estesa a tutte le fauci ed alle narici. Presa del materiale in seconda giornata, prima dell' intervento sieroterapico Iniezione di 3000 U. I. Guarigione.

L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler con streptococco piogeno. Riguardo alla forma bacillare, predominavano i piccoli, ve ne erano molti di grandezza media, bene colorati, senza lacune e scarsissime forme clavate.

---

[1] S. Dziergowski. *Sur la filtration des substances albuminoïdes à propriétés actives*. Archives des scienc. biolog. St. Pétersbourg, 1895 Th. IV, n 3

[2] Behring. *Fortschritte der Medic.* 1. Ian. 1897.

Dopo un mese di coltura in brodo si vedevano esclusivamente le forme grandi con numerose lacune non colorate, ed abbondanti le forme clavate. Il liquido filtrato fu inoculato alle cavie con i seguenti risultati:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
14 febb. 1896	Cavia 1ª	259 gram.	0. 04 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	354 id.	0. 11 °/₀	Id.
19 febb. 1896	Id. 3ª	453 id.	0. 16 °/₀	Id.
Id.	Id. 4ª	520 id.	0. 20 °/₀	Id.
25 febb. 1896	Id. 5ª	370 id.	0. 3 °/₀	Morta dopo 8 giorni
Id.	Id. 6ª	385 id.	0. 4 °/₀	Morta dopo 7 giorni
1 marzo 1896	Id. 7ª	510 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 5 giorni
Id.	Id. 8ª	240 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 4 giorni

La dose minima mortale fu per conseguenza di 0,005 per ogni grammo di peso di animale.

Caso II. (23 gennaio 1896). Fall.... Ida, di anni 6. Localizzazione laringea nel periodo asfittico (VI giornata). Il materiale fu preso da una grossa e lunga falsa membrana emessa colla intubazione. Fino allora non era stata praticata alcuna iniezione di siero. La sieroterapia fu iniziata nello stesso momento della intubazione ed in tutto furono iniettate 4000 U. I. Guarigione.

L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, scarse colonie di stafilococco piogene aureo, ed abbondanti di streptococco piogene. Le forme bacillari erano tutte piccolissime, alcune non uniformemente colorate. Dopo un mese di coltura in stufa erano scomparse le forme piccolissime, e predominavano le forme medie alcune con vacuoli, altre a clava. Il liquido di coltura filtrato dette i seguenti risultati:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
25 febb. 1896	Cavia 1ª	210 gram.	0. 12 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	215 id.	0. 23 °/₀	Id.
1 marzo 1896	Id. 3ª	535 id.	0. 35 °/₀	Id.
Id.	Id. 4ª	412 id.	0. 4 °/₀	Id.
Id.	Id. 5ª	325 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 6ª	225 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 3 giorni

Dose minima mortale 0. 005.

Caso III. (18 gennaio 1896). Dubini Giuseppe di anni 8 (Ospedale). Localizzazione a tutte le fauci. Presa del materiale in IV giornata, ed inizio della cura col siero (3000 U. I.). Forma molto grave. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler e predominanti moltissime colonie di streptococco piogene. Il bacillo di Loeffler aveva forme di media grandezza, tozze, bene colorite e con rare forme grandi e clavate. Dopo un mese di stufa apparivano solo le forme grandi a grosse clave. Il liquido di coltura filtrato si comportò colle cavie nel modo seguente:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
7 marzo 1896	Cavia 1ª	380 gram.	0.05 %	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	420 id.	0.1 %	Morta dopo 8 giorni
10 marz. 1896	Id. 3ª	315 id.	0.14 %	Morta dopo 7 giorni
Id.	Id. 4ª	235 id.	0.2 %	Morta dopo 4 giorni
13 marz. 1896	Id. 5ª	325 id.	0.3 %	Morta dopo 50 ore
Id.	Id. 6ª	280 id.	0.5 %	Morta dopo 48 ore

Dose di tossina minima mortale 0. 005.

Caso IV. (17 gennaio 1896). Dubini Giovanni di un anno, fratello del precedente (Ospedale). Localizzazione a tutte le fauci, bocca e narici. Adenopatie notevolissime con edema perighiandolare. Presa del materiale e sieroterapia in III giornata Unità immunizzanti iniettate 4000. Forma estremamente grave. Morte. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler unito a moltissime colonie di streptococco piogene. Il bacillo di Loeffler si mostrò con molte forme piccole e quasi nella stessa proporzione con forme di media grandezza bene colorate. Dopo un mese di stufa si vedevano solo le forme grosse clavate.

Il liquido filtrato dette i seguenti risultati nelle cavie:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
7 marzo 1896	Cavia 1ª	350 gram.	0.5 %	Morta dopo 18 ore
Id.	Id. 2ª	280 id.	0.3 %	Morta dodo 20 ore
9 marzo 1896	Id. 3ª	380 id.	0.1 %	Morta dopo 30 ore
Id.	Id. 4ª	280 id.	0.02 %	Morta dopo 6 giorni
12 marz. 1896	Id. 5ª	285 id.	0.03 %	Morta dopo 5 giorni
Id.	Id. 6ª	220 id.	0.04 %	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 7ª	230 id.	0.06 %	Morta dopo 2 giorni
Id.	Id. 8ª	325 id.	0.04 %	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0. 0004.

CASO V. (26 gennaio 1896) Ces.... E., di anni 7. Localizzazione alle fauci ed alle narici. Adenopatia notevole con edema perighiandolare. Presa del materiale ed inizio della sieroterapia in III giornata; U. I. inoculate 4000. Forma clinica gravissima. Morte. All'esame batteriologico si ebbe bacillo di Loeffler, e varie colonie di stafilococco piogene aureo ed abbondanti di streptococco piogene. Il bacillo della difterite presentavasi solo sotto l'aspetto di forme grosse, molte terminate a clava. Dopo un mese di stufa erano forme grandissime, parecchie a clava.

Il liquido filtrato dette nelle cavie i seguenti risultati:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
17 marz. 1896	Cavia 1ª	210 gram.	0. 01 %	Morta dopa 7 giorni
Id.	Id. 2ª	390 id.	0. 02 %	Sopravvissuta
30 marz. 1896	Id. 3ª	210 id.	0. 05 %	Id.
Id.	Id. 4ª	300 id	0. 1 %	Id.
Id.	Id. 5ª	340 id.	0. 2 %	Id.
18 aprile 1896	Id. 6ª	470 id.	0. 3 %	Morta dopo 7 giorni
Id.	Id. 7ª	320 id.	0. 4 %	Morta dopo 5 giorni
Id.	Id. 8ª	260 id.	0. 5 %	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0. 005.

CASO VI. (10 marzo 1896). Faucero Ludovico, di 2 anni e mezzo (Ospedale). Localizzazione alle fauci, laringe e bronchi. Sieroterapia e raccolta del materiale in III giornata di malattia; U. I. inoculate 2000. Morte dopo 15 ore dalla iniezione.

L'esame batteriologico dette bacillo della difterite, e varie colonie di stafilococco piogene aureo ed albo, ed abbondanti di streptococco piogene. Il bacillo di Loeffler presentava esclusivamente forme di media grandezza benissimo colorate. Dopo un mese di stufa si vedevano le stesse forme di media grandezza per la massima parte però non colorate uniformemente, insieme a molte forme grandi ed a clava.

Il potere tossico del liquido filtrato fu il seguente:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
30 marz. 1896	Cavia 1ª	215 gram.	0. 05 %	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	322 id.	0. 1 %	Id.
3 aprile 1896	Id. 3ª	340 id.	0 2 %	Id.
Id.	Id. 4ª	450 id.	0. 3 %	Id.
10 aprile 1896	Id. 5ª	275 id.	0. 5 %	Morta dopo 8 giorni
Id.	Id. 6ª	270 id.	0. 7 %	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 7ª	350 id.	1. %	Morta dopo 2 giorni

Dose minima mortale 0. 007.

Caso VII. (22 giugno 96). Ricci Vincenzo, di anni 3. (Ospedale). Localizzazione alle fauci ed alla laringe. Forma difterica gravissima insorta nel corso di un morbillo. Bronco-pulmonite. Sieroterapia in II giornata (U. I. 3000) e contemporaneamente raccolta del materiale. Morte. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler associato ad abbondantissime colonie di streptococco piogene. Erano forme bacillari esclusivamente piccole non benissimo ed uniformemente colorate. Dopo un mese di stufa si vedevano solo forme grandissime ed a clava.

Il liquido filtrato dette i seguenti risultati:

Data d' inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
3 aprile 1896	Cavia 1ª	267 gram.	0. 1 %	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	180 id.	0. 2 %	Id.
6 aprile 1869	Id. 3ª	210 id.	0. 3 %	Morta dopo 6 giorni
Id.	Id. 4ª	300 id.	0. 4 %	Morta dopo 7 giorni
Id.	Id. 5ª	240 id.	0. 5 %	Morta dopo 5 giorni
Id.	Id. 6ª	270 id.	0. 6 %	Morta dopo 3 giorni

Dose minima mortale 0,006.

Caso VIII. (25 febbraio 96). Serafino Giuseppe, di anni 8. (Ospedale). Localizzazione laringea. Forma mite ad andamento lentissimo. Sieroterapia dopo un mese. Raccolta del materiale di ricerca dopo due mesi, e dopo di avere avuto già iniettate 5000 U. I. Tracheotomia dopo 3 mesi. Guarigione L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, streptococco piogene, e pneumo-bacillo di Fiedländer. Il bacillo di Loeffler era dato da forme di media grandezza con molte grandi ed a clava. Dopo un mese di stufa in brodo esistevano solo le forme grandi, non bene colorate, a clava.

Il liquido filtrato dette questi risultati:

Data d' inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
4 aprile 1896	Cavia 1ª	370 gram.	0. 5 %	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	170 id.	1. %	Id.
22 aprile 1896	Id. 3ª	230 id.	2. %	Morta dopo 10 giorni
Id.	Id. 4ª	200 id.	3. %	Morta dopo 3 giorni

Dose minima mortale 0. 03.

Caso IX. (20 giugno 96). Margutti Gregorio, di anni 2. (Ospedale). Localizzazione laringea nel corso del morbillo in soggetto atrofico. Broncopolmonite. Morte rapidissima prima dell'intervento della sieroterapia. L'esame batteriologico su materiale preso dal cadavere dette colonie di bacillo di Loeffler, ed in predominio di streptococco piogene. Forme bacillari piccole, tozze, bene colorite. Dopo un mese di stufa si vedevano forme esclusivamente grandi, ed a clava.

La tossicità del liquido filtrato fu la seguente:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
2 aprile 1896	Cavia 1ª	200 gram.	0. 2 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	220 id.	0 4 °/₀	Id
14 aprile 1896	Id. 3ª	250 id.	0. 5 °/₀	Id.
Id.	Id. 4ª	270 id.	0. 7 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 5ª	225 id.	1. °/₀	Morta in 48 ore

Dose minima mortale 0. 007.

Caso X. (21 giugno 96). Castellani Giuseppe, di anni 1 1\|2. (Ospedale). Forma clinica perfettamente simile alla precedente e rapidamente mortale. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, abbondante streptococco piogene, e scarsi lo stafilococco piogene aureo ed il pneumo-bacillo di Friedländer. Il bacillo di Loeffler presentava forme di media grandezza associate a molte grandi. Dopo un mese di stufa le forme grandi erano le sole che si scorgevano con grosse clave.

La tossicità del liquido filtrato fu la seguente:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
12 aprile 1896	Cavia 1ª	350 gram.	0. 1 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	230 id.	0. 2 °/₀	Id.
18 aprile 1896	Id. 3ª	230 id.	0. 25 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 4ª	170 id.	0. 3 °/₀	Morta dopo 3 giorni
Id.	Id. 5ª	230 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 2 giorni

Dose minima mortale 0. 003.

Caso XI. (8 marzo 96). Ceccarelli Annunziata, di anni 3. (Ospedale). Localizzazione alle fauci, laringe, bronchi. Forma gravissima. Presa del materiale ed inizio della sieroterapia al II giorno di malattia, U. I. iniettate 6000. Morte. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, stafilococco piogene

aureo, ed abbondante streptococco piogene. Forme di media grandezza miste a forme grosse, non bene colorate, spezzettate. Dopo un mese di stufa si vedevano esclusivamente forme grandi clavate Ripetuta la ricerca dopo morte si ebbe lo stesso reperto batteriologico, più il pneumo-bacillo di Friedländer. La forma bacillare era uguale a quella indicata nell'esame precedente.

La tossicità del liquido filtrato fu esaminata tanto colle colture ricavate dal bacillo durante la vita, quanto da quello ricavato post mortem:

Bacillo isolato in 2ª giornata di malattia.

Data d' inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
4 magg. 1896	Cavia 1ª	300 gram.	0. 2 %	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	240 id.	0. 5 %	Morta dopo 9 giorni
7 magg. 1896	Id. 3ª	290 id.	0. 7 %	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 4ª	250 id.	0. 9 %	Morta dopo 48 ore
Bacillo isolato post mortem.				
12 magg. 1896	Cavia 5ª	280 gram.	0. 7 %	Sopravvissuta
Id.	Id. 6ª	320 id.	0. 8 %	Morta dopo 9 giorni
Id.	Id. 7ª	230 id.	1. %	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0 007. — Dose id , post mortem 0. 01.

Caso XII. (14 marzo 96). Maranno Antonio, di anni 4. (Ospedale). Localizzazione laringea. Raccolta del materiale e sieroterapia in I. giornata. U. I. iniettate 3000. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo della difterite, streptococco piogene ed abbondante pneumo-bacillo di Friedländer. Forme bacillari grandi non bene colorate, molte a clava. Dopo un mese di stufa le forme bacillari erano ancora più grandi, non bene colorate, moltissime a grosse clave.

Il liquido filtrato mostrò la tossicità qui sotto indicata:

Data d' inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
16 aprile 1896	Cavia 1ª	300 gram.	0. 05 %	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	320 id.	0. 1 %	Morta dopo 5 giorni
19 aprile 1896	Id. 3ª	320 id.	0. 2 %	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 4ª	250 id.	0. 5 %	Morta dopo 48 ore

Dose minima mortale 0. 002.

Caso XIII. (11 marzo 96). Rossi Giuseppe, di anni 4. (Ospedale). Localizzazione alle fauci e laringe. Sieroterapia e raccolta del materiale in V giornata. U. I. iniettate 5000. Forma clinica gravissima. Miglioramento dopo 48 ore dal principio della cura Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, abbondante il pneumo-bacillo di Fiedländer, e scarso lo streptococco piogene. Forme bacillari grandi, molte a clava, non bene colorate. Dopo un mese di stufa comparivano ancora più grandi, e meno uniformemente colorate.

L'esame della tossicità del liquido filtrato dette il seguente risultato:

Data d' inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
12 magg. 1897	Cavia 1ª	340 geam.	0. 1 °/₀	Morta dopo 7 giorni
Id.	Id. 2ª	320 id.	0. 2 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 3ª	250 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 48 ore

Dose minima mortale 0. 002.

Caso XIV. (27 marzo 96). De Benedetti Giulio di anni 4. (Ospedale). Localizzazione alle fauci, narici e laringe. Notevoli adenopatie. Tubercolosi con escavazione dell'apice polmonare destro. Sieroterapia e raccolta del materiale in II. giornata. U. I. iniettate 3000. Forma clinica gravissima. Morte in III. giornata di malattia. L'esame batteriologico dette bacillo della difterite, abbondante lo streptococco piogene, pneumo-bacillo di Friedländer, bacillo di Koch. Forme bacillari piccole, bene colorate, senza vacuoli. Dopo un mese di stufa in brodo si vedevano solo forme grandissime. non bene colorate.

La tossicità del liquido filtrato fu la seguente:

Data d' inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
16 magg. 1896	Cavia 1ª	270 gram.	0. 2 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	240 id.	0. 5 °/₀	Id.
25 magg. 1896	Id. 3ª	230 id.	0. 7 °/₀	Morta dopo 9 giorni
Id.	Id. 4ª	270 id.	1. °/₀	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0. 01.

Caso XV. (28 marzo 96). Pandori Alfonso, di anni 8. Localizzazione laringea. Tubercolosi con infiltrazione di ambedue gli apici polmonari. Sieroterapia in I. giornata, e raccolta del materiale. Forma non grave (per l'in-

tervento precoce della sieroterapia?) U. I. inoculate 3000. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo della difterite, stafilococco piogene aureo ed albo, streptococco piogene, bacillo di Koch. Forme bacillari piccole, bene colorate, qualche forma corta, con rigonfiamento a clava. Dopo un mese di stufa si vedevano forme bacillari grandi non bene colorate.

Tossicità del liquido filtrato:

Data d' inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
12 magg. 1896	Cavia 1ª	380 gram.	0. 2 %	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	150 id.	0. 5 %	Morta dopo 13 giorni
20 magg. 1896	Id. 3ª	280 id.	0. 8 %	Morta dopo 7 giorni
Id.	Id. 4ª	250 id.	1. %	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0. 01.

Caso XVI. (30 marzo 1896). Capocci Giulio di anni 3 (Ospedale). Localizzazione alle fauci e naso. Adenopatie considerevoli. Forma discretamente grave. Raccolta del materiale ed inizio della sieroterapia in VIII giornata. U. I. iniettate 3000. Guarigione. L' esame batteriologico dette bacillo di Loeffler e streptococco (rare colonie). Forme bacillari piccole, benissimo colorate. Dopo un mese di stufa non si vedevano che forme grandi, a clava. non uniformemente colorate. Tossicità del liquido filtrato:

Data d' inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
10 magg. 1896	Cavia 1ª	260 gram.	0. 2 %	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	240 id.	0. 5 %	Id.
Id.	Id. 3ª	240 id.	0. 7 %	Id.
29 magg. 1896	Id. 4ª	320 id.	1. %	Morta dopo 6 giorni
Id.	Id. 5ª	230 id.	1. 5 %	Morta dopo 6 giorni
Id.	Id. 6ª	260 id.	2. %	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 7ª	300 id.	3. %	Morta dopo 2 giorni

Dose minima mortale 0. 02.

Caso XVII. (30 marzo 1896). Capocci Andrea di anni 5 fratello del precedente. (Ospedale). Localizzazione alle fauci, adenopatie gravi seguite da suppurazione. Forma clinica molto grave. Raccolta del materiale e sierote-

rapia in VII giornata. U. I. iniettate 4000. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, streptococco piogeno, e scarse colonie di stafilococco piogeno aureo. Forme bacillari piccole, bene colorate. Dopo un mese di stufa si avevano solo bacilli grossi, lunghi, terminati a clava, non uniformemente colorati. Tossicità del liquido filtrato:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
16 magg. 1896	Cavia 1ª	260 id.	0.2 $^0/_0$	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	270 id.	0.5 $^0/_0$	Id.
Id.	Id. 3ª	300 id.	0.8 $^0/_0$	Morta dopo 8 giorni
Id.	Id. 4ª	290 id.	1. $^0/_0$	Morta dopo 3 giorni
Id.	Id. 5ª	320 id.	1. $^0/_0$	Morta dopo 4 giorni
		Dose minima mortale 0. 01		

Caso XVIII (4 aprile 1896). Manfredi Ines di anni 2 (Ospedale). Localizzazione alle fauci ed alla laringe. Adenopatie notevoli. Nefrite. Forma molto grave. Presa del materiale ed inizio della sieroterapia in II giornata. U. I. iniettate 6000. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo difterico, e rarissime colonie di streptococco, e di stafilococco piogeno aureo. Forme bacillari piccole, bene colorate. Dopo un mese di stufa si vedevano solo bacilli grossi, lunghi, terminati a clava. Tossicità del liquido filtrato:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
25 magg. 1896	Cavia 1ª	270 gram.	0.2 $^0/_0$	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	260 id.	0.5 $^0/_0$	Id.
30 magg. 1896	Id. 3ª	300 id.	0.7 $^0/_0$	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 4ª	290 id.	1. $^0/_0$	Morta in 48 ore
		Dose minima mortale 0. 007.		

Caso XIX. (23 aprile 1896). Zappi Umberto di anni 1 (Ospedale). Localizzazione alle fauci, bocca, faringe, naso, laringe, bronchi, polmoni. Pericondrite nasale suppurata, ascesso al labbro superiore. Bronco polmonite. Strepto-stafilococcemia. Forma clinica estremamente grave. Raccolta del materiale ed inizio della sieroterapia in IV giornata. Nuovo materiale fu raccolto dopo la morte. U. I. iniettate 4000. Morte. L'esame batteriologico fatto in vita dette bacillo di Loeffler non abbondante, abbondantissimo lo

stafilococco piogeno aureo, scarso lo stafilococco piogeno albo e lo streptococco. L'esame batteriologico post mortem dette bacillo di Loeffler, ed abbondanti lo streptococco e lo stafilococco aureo. Questi due ultimi microrganismi furono trovati abbondantissimi nel sangue del cuore, nei polmoni, nella milza, nel pus degli ascessi. Inoculato lo stafilococco aureo in due cavie le uccise in 24 ore, producendo un flemmone esteso a tutto l'addome ed al dorso. Anche lo streptococco produsse ascesso e morte degli animali, ma meno rapidamente.

Il bacillo di Loeffler isolato durante la vita mostrava forme di media grandezza, con predominio di forme grosse e clavate, ma bene colorate. Dopo un mese di stufa apparivano soltanto le forme grandi, non più colorabili uniformemente. Quello isolato post mortem presentò la stessa morfologia. La tossicità dei liquidi filtràti di coltura dette i seguenti risultati:

Bacillo isolato in vita.

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
2 giug. 1896	Cavia 1ª	320 gram.	0. 2 %	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	310 id.	0. 5 %	Morta dopo 6 giorni
Id.	Id. 3ª	250 id.	0. 7 %	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 4ª	300 id.	1. %	Morta dopo 48 ore

Dose minima mortale 0. 007

Bacillo isolato post mortem.

9 giug. 1896	Cavia 5ª	300 gram.	0. 5 %	Morta dopo 20 giorni
Id.	Id. 6ª	260 id.	0. 7 %	Morta dopo 15 giorni
Id.	Id. 7ª	300 id.	1. %	Morta dopo 10 giorni
Id.	Id. 8ª	500 id.	2. %	Morta dopo 8 giorni
Id.	Id. 9ª	275 id.	3. %	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0. 03

Caso XX. (18 maggio 1896). Secchi Angiolina di anni 5 (Ospedale). Localizzazione alle fauci e faringe. Ingorgo ghiandolare. Forma clinica mediocremente grave. Raccolta del materiale ed inizio della sieroterapia in terza giornata. U. I. iniettate 3000. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler streptococco e scarse colonie di stafilococco piogene aureo. Forme bacillari piccole bene colorate, alcune terminate a clava Dopo un

mese di stufa vi erano solo forme grandi, alcune grandissime, a clava, non colorate uniformemente. Tossicità del liquido filtrato:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
17 giug. 1896	Cavia 1ª	430 gram.	0. 2 %	Morta dopo 48 ore
Id.	Id. 2ª	320 id.	0. 5 %	Morta dopo 30 ore
19 giug. 1896	Id. 3ª	390 id.	0. 1 %	Morta dopo 3 giorni
Id.	Id. 4ª	320 id.	0. 08 %	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0. 0008.

Caso XXI. (4 maggio 1896). De Santis Ernesto di anni 5 (Ospedale). Localizzazione alle fauci ed alla laringe. Forma clinica non molto grave. Raccolta del materiale ed inizio della sieroterapia in III giornata. U. I. iniettate 4400. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, e scarsi lo streptococco e lo stafilococco piogeno albo. Forme bacillari piccole non bene colorate. Dopo un mese di stufa si ebbero invece forme grandissime, a clava, non bene colorate. Tossicità del liquido filtrato:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculato	Risultato
17 giug. 1897	Cavia 1ª	460 gram.	0. 2 %	Morta dopo 8 giorni
Id.	Id. 2ª	420 id.	0. 5 %	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 3ª	370 id.	0. 7 %	Morta dopo 48 ore

Dose minima mortale 0. 005.

La tabella che segue riassume i risultati delle esperienze ora descritte e mette sott'occhi in ogni singolo caso la forma bacillare colla tossicità del bacillo medesimo rappresentata dalla dose minima capace di uccidere in 4 giorni un grammo di cavia.

Caso	Batterii associati al bacillo di Loeffler	Forma Bacillare		Dose minima mortale di tossina	Forma clinica
		Dopo 48 ore in agar	Dopo 1 mese in brodo		
I	Streptococco piogeno	Forme piccole e medie. Bene colorate, scarse forme clavate.	Forme baccillari grandi con spari incolori, numerose forme clavate.	0. 005	Discretamente grave. Guarigione.
II	Streptococco piogeno. Stafilococco p. aureo.	Forme piccolissime	Forme di media grandezza, alcune con vacuoli, altre a clava.	0. 005	Mite. Guarigione.
III	Streptococco.	Forme di media grandezza, bene colorate, varie forme grandi ed a clava.	Form grandi con grosse clave.	0. 002	Grave. Guarigione.
IV	Streptococco	Abbondanti le forme piccole, molte di media grandezza.	Forme grosse clavate.	0. 0004	Gravissima. Morte.
V	Streptococco p. Stafilococco p. aureo.	Forme grandi, parecchie a clava.	Forme grandissime ed a clava	0. 005	Gravissima. Morte.
VI	Steptococco p. Stafilococco p. aureo Stafilococco p. albo	Forme di media grandezza.	Forme grandi non bene colorate, molte a clava.	0. 007	Gravissima. Morte.
VII	Streptococco p.	Forme piccole non bene colorate.	Forme grandissime a clava.	0. 006	Gravissima. Morte.

Caso	Batterii associati al bacillo di Loffler	Forma Bacillare		Dose minima mortale di tossina	Forma clinica
		Dopo 48 ore in agar	Dopo 1 mese in brodo		
VIII	Streptococco p. Pneumo bacillo di Friedländer.	Forme di media grandezza, molte grosse, a clava.	Forme grandissime bene colorate.	0. 03	Mite. Guarigione,
IX	Streptococco p.	Forme piccole tozze.	Forme grandi, a clava.	0. 007	Gravissima. Morte.
X	Streptococco p. Stafilococco p. aureo. Pneumo bacillo di Friedländer.	Forme di media grandezza, molte grandi.	Forme grandi, con grosse clave.	0. 003	Gravissima. Morte.
XI	Streptococco p. Stafilococco p. aureo.	Forme di media grandezza, molte grosse con vacuoli.	Forme grandi a clava.	0. 007	Gravissima. Guarigione.
XII	Streptococco p. Pneumo bacillo di Friedländer.	Forme grandi, molte a clava con vacuoli.	Forme grandissime non bene colorate.	0. 002	Mite. Guarigione.
XIII	Streptococco p. Pneumo bacillo di Friedländer.	Forme grandi con vacuoli.	Forme grandi non colorate uniformemente.	0. 002	Grave. Guarigione.
XIV	Streptococco p. Pneumo bacillo di Friedländer. Bacillo tub. di Koch.	Forme piccole benissimo colorate.	Forme grandissime poco colorate.	0. 01	Gravissima. Morte.

Caso	Batterii associati al bacillo di Loeffler	Forma Bacillare		Dose minima mortale di tossina	Forma clinica
		Dopo 48 ore in agar	Dopo 1 mese in brodo		
XV	Streptococco p. Stafilococco p aureo. Stafilococco p. albo. Bac. tub. di Koch.	Forme piccole, frequenti forme a clava.	Forme grandi.	0.01	Mite. Guarigione.
XVI	Streptococco p.	Forme piccole benissimo colorate.	Forme grandi, a clava, non colorate uniformemente.	0.02	Grave. Guarigione.
XVII	Streptococco p. Stafilococco p. aureo.	Forme piccole bene colorate.	Forme grandi a clava.	0.01	Grave. Guarigione.
XVIII	Streptococco p. Stafilococco p. aureo.	Forme piccole bene colorate.	Forme grandi clavate.	0.007	Grave. Guarigione.
XIX	Streptococco p. Stafilococco p. albo. Stafilococco p. aureo.	Forme di media grandezza, numerose le grandi a clava.	Forme grandi non bene colorate.	0.007	Gravissima. Morte.
XX	Streptococco p. Stafilococco p. aureo.	Forme piccole, alcune e clava.	Forme grandi, alcune grandissime a clava.	0.0008	Grave. Guarigione.
XXI	Streptococco p. Stafilococco p albo.	Forme piccole, alcune non bene colorate.	Forme grandissime a clava.	0.005	Mediocremente grave. Guarigione.

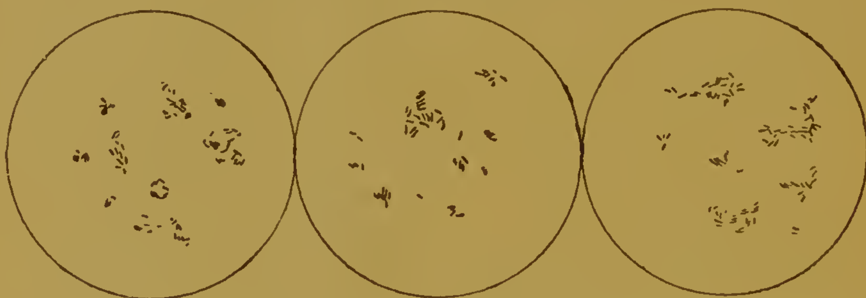
Dall'insieme di queste esperienze la prima conseguenza che ci pare risulti evidente è il nessun rapporto che esiste tra la tossicità del bacillo di Loeffler e la modalità di forma che il medesimo possa presentare nei prodotti difterici e nelle colture. Sia che i bacilli presentino la forma piccola, o la media o la grande, sia che si mostrino disposti parallelamente od a *V* o ad *L*, o variamente ed irregolarmente intrecciati, che presentino o no la forma clavata, ecc. qualunque sieno le condizioni di forma, o di disposizione, possono mostrarsi forniti di vario potere tossico nei loro prodotti. Così vediamo che il liquido filtrato da colture di bacilli piccoli, corti, ha dato un grado di tossicità rappresentato da un massimo di 0,005 (casi II e XXI) ad un minimo di 0,02 (caso XVI). E precisamente negli otto casi in cui l'esame batteriologico rilevò solo forme piccole il grado di tossicità fu rappresentato da 0.005 (casi II e XXI), 0,006 (caso VII), 0,007 (casi IX e XVIII), 0.01 (casi XIV e XVII) e 0,02 (caso XVI). Nel caso di forme medie la tossicità fu di 0,007 (caso VI). In tre casi di forme esclusivamente grandi avemmo 0,002 (casi XII e XIII) e 0,005 (caso V). I due casi di forme miste piccole e medie ci dettero 0,0004 (caso IV) e 0,005 (caso I). I due di forme miste piccole e grandi ci dettero 0,0008 (caso XX) e 0.01 (caso XV). E finalmente nei cinque casi di forme miste medie e grosse vediamo da un massimo di tossicità di 0,002 (caso III) discendere a 0,003 (caso X), a 0,007 (casi XI e XIX) fino a 0,03 (caso VIII) che rappresenta il grado di tossicità meno elevato di tutte le nostre osservazioni, malgrado che dalla forma bacillare si sarebbe dovuto diagnosticare un grado molto forte di tossicità. È così che vediamo lo stesso grado di tossicità p. es. il 0,007 comune alle forme piccole (casi IX e XVIII) alle forme medie (caso VI) ed alle forme miste grosse e medie (casi XI e XIX); e la stessa osservazione può ripetersi per gli altri gradi di tossicità.

Ripetiamo per conseguenza che la varia forma bacillare nulla dice in rapporto alla maggiore o minore potenza patogena del bacillo di Loeffler, e che non è assolutamente possibile di stabilire il grado maggiore o minore di gravezza ed il pronostico in genere dalla forma che il bacillo presenta sia nei prodotti difterici sia nei primi terreni in cui lo si coltiva. Ed agirebbe molto leggermente, per non dire colposamente quel medico che giudicasse della morfologia del bacillo, sulla opportunità o no di intervenire terapeuticamente col siero antidifterico. Qualunque sia la forma, qualunque la sua disposizione, quando esiste il bacillo di Loeffler si deve quanto prima è possibile, ed energicamente intervenire colla sieroterapia, perchè vedemmo, malgrado la sola esistenza di forme bacillari piccole, aversi casi clinicamente gravi e mortali, ed

aversi dei prodotti tossici di alto potere patogeno nè più nè meno che colle forme grosse.

Noi abbiamo veduto che, sempre e costantemente, nelle colture in brodo, vecchie di un mese, le forme bacillari grandi che non bene si coloriscono, che terminano a clava, sono le uniche ad osservarsi, qualunque sia stata la forma bacillare primitiva con cui il brodo era stato inquinato. Nelle vecchie colture le forme piccole scompaiono ed anche le medie si fanno scarse, per trasformarsi tutte nelle grosse forme bacillari. Diamo qui alcune figure di preparati prese a caso, essendosi ripetuta in ogni osservazione la stessa trasformazione:

Dopo due giorni in agar a 36°.



Dopo un mese in brodo a 36°.



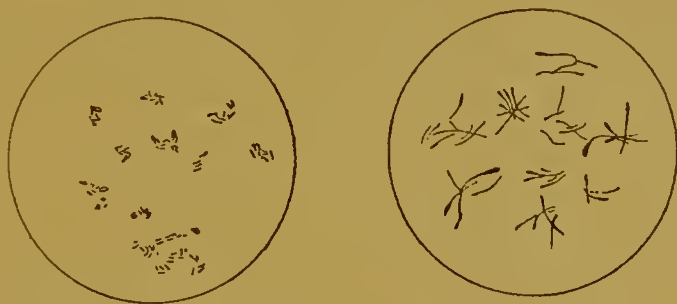
Finora queste forme grosse sono state considerate come prodotto di sviluppo abnorme. Secondo Flügge esse sono specialmente interessanti perchè forse gettano un poco di luce sulle parentele dei bacilli a cui appartiene il gruppo della difterite. Forme perfettamente analoghe accadono eccezionalmente nel gruppo della tubercolosi e regolarmente nelle streptotrices, da far pensare ad un legame filogenetico tra questi tre gruppi, al che si aggiunge il legame del carattere di lento sviluppo, del colorirsi col Gram, ecc. [1] Potrebbero per conseguenza tali forme grosse venire considerate come forme regressive con ritorno atavistico.

---

[1] Flügge. *Die Mikroorganismen.* Vol. II, Leipzig, 1896, pag. 460.

se non si vuole ritenerlo per forme involutive, di degenerazione del bacillo difterico. Abbiamo veduto che esse compariscono e restano, esse esclusivemente, nei terreni di coltura, mano mano che invecchiano; e dopo un mese di stufa, quando già esse si avvicinano alla morte, nei brodi non si hanno più che forme grandi.

Vi è ancora un'altra condizione che facilita rapidamente il passaggio dalle forme piccole alle forme grandi. Studiando i rapporti fra bacillo di Loeffler e streptococchi abbiamo veduto come facendo vivere insieme questi due microrganismi sopra uno stesso terreno solido, su agar agar glicerinato, dopo solo 4 giorni si nota che le forme bacillari piccole primitive sono tutte trasformate in forme grandissime, clavate, come apparisce dal seguente preparato:



E ciò che è più notevole è il fatto che passando queste forme giganti dall'agar sul siero di sangue di vitello, successivamente si ritorna alle forme bacillari piccole primitive. Deve dirsi che le condizioni sfavorevoli di vita in cui il bacillo si trova a vegetare, influiscano sul suo sviluppo in modo da rendere più rapido il suo periodo di invecchiamento.

Un'altra osservazione risulta dai nostri esperimenti, ed è l'influenza del terreno su cui attecchisce il bacillo di Loeffler sulla sua tossicità. Nei casi III e IV si trattava di due fratelli colti contemporaneamente da difterite, e che per ciò devono essere stati contagiati dalla stessa fonte, dallo stesso microrganismo. In ambedue si aveva la stessa associazione batterica dello streptococco piogene. La raccolta del materiale si fece presso a poco alla stessa epoca di malattie (3^a e 4ª giornata). Medesima fu la localizzazione, salvo che in uno dalle fauci si estese alle narici, senza interessamento laringeo. Ora nel primo, cominciato a curare in 4^a giornata, e con 3000 U. I. si ebbe la guarigione, e la tossicità della tossina era rappresentata da 0,002, mentre nel secondo, malgrado la cura fosse iniziata al 3^0 giorno e con 5500 U. I. si ebbe la morte e la tossicità del liquido filtrato fu di 0,0004. Ossia in questo

secondo la tossicità del bacillo di Loeffler acquistò un potere patogeno cinque volte maggiore che nel primo. Devesi dunque dire che il terreno su cui il bacillo di Loeffler attecchisce, influisce molto sulla sua tossicità. In questo secondo caso si trattava di un bambino di un anno, mentre nel primo si era già raggiunta l'età di 8 anni. Ora si sa che uno dei fattori che determinano il variare del pronostico nella difterite è dato dall'età, sia che questa influisca sulla resistenza e sulla reazione alle cause morbigene, sia che col progredire degli anni si vengano a stabilire certe immunità di cui non sappiamo rintracciare la causa, e che potrebbero anche essere indotte da leggere, inavvertite influenze tossiche succedutesi a varie epoche della vita.

Queste idee potrebbero trovare una conferma anche da qualche altra nostra osservazione. Nei casi XI e XIX l'esame della tossicità del bacillo di Loeffler si fece durante la vita in 2ª e 4ª giornata di malattia e dopo la morte avvenuta dopo 10-5 giorni dalla presa del primo materiale. In ambedue i casi si trovò che la tossicità del bacillo isolato *post mortem* era molto diminuita. Infatti nel 1° caso da 0.007 si era scesi a 0,01: nel secondo caso pure da 0,007 si era scesi nientemeno che a 0,03. Si doveva dunque dire che la potenza patogena in questi due casi si era venuta attenuando, e ciò crediamo per la influenza della sieroterapia. Nel primo caso erano state iniettate in 10 giorni 6000; e nel secondo 4000 U. I. in 5 giorni. Anche altre volte avevamo notato come ripetendo l'esame batteriologico dopo alcuni giorni dall'inizio della sieroterapia, il bacillo di Loeffler si mostrava attenuato nel suo potere patogeno. Ciò nei casi che volgevano alla guarigione poteva ricevere una facile spiegazione. Ma in questi due casi terminati con la morte la cosa restava meno concepibile. Eppure se si considera la questione da un punto di vista non tanto superficiale e non esclusivamente unilaterale anche di questi due casi si può trovare una ragione convincente non solo, ma vi si trova la conferma di quanto uno di noi in altri lavori ha sostenuto, che cioè la difterite deve considerarsi come un fatto molto complesso in cui entrano in gioco, il bacillo di Loeffler, le associazioni batteriche, e l'organismo malato con i suoi vari gradi di resistenza locale e generale; come pure si trova la conferma che gli insuccessi della sieroterapia antidifterica nella massima parte dei casi sono dovuti a cause estranee alla sieroteroterapia medesima.[1] In questi due casi sotto l'influenza della sieroterapia la

[1] Concetti L. *Beobachtungen Ueber Pathogenese und Therapie der diphteritis.* Allg. Wien. med. Zeitung, 1894.

Nuove osservazioni sulla sieroterapia antidifterica. Bull. della R. Accad. Med. di Roma, 1895.-96. Fasc. VII.

forma clinica della difterite si era venuta evidentemente migliorando: gli essudati si limitavano ed in parte non riproducevano, le adenopatie si riducevano notevolmente, la respirazione laringea era più libera. Ma in ambedue un processo di bronco-pulmonite impose per suo conto un aggravamento del processo morboso, e nel secondo fu messa in evidenza una setticoemia stafilo-streptococcica. Anche altre volte avevamo avuto occasione di osservare tali fatti, ma tali osservazioni erano state più superficiali, e fatte solo dal punto di vista clinico; e la ricerca batteriologica si era limitata alla constatazione della presenza di un bacillo di Loeffler virulento. Anche la esistenza delle associazioni microbiche era stata da noi constatata.

Ma rimaneva sempre indecisa la questione, di sapere sino a qual punto queste associazioni dovessero essere incolpate, e quale importanza conservasse la infezione difterica. In questi due casi abbiamo potuto dimostrare come la infezione difterica veniva cedendo, come sempre, il terreno di fronte alla sieroterapia, tanto da avere non solo il miglioramento della località malata, ma da poter constatare la diminuzione di tossicità dei prodotti del bacillo di Loeffler, tanto che p. es. nel secondo caso, come dicemmo si scese da 0.007 a 0.03, ossia si ebbero dei prodotti 4-5 volte meno tossici. Per quello poi che riguarda le associazioni batteriche, nel primo caso (XI) si isolò uno streptococco piogene che inoculato nel peritoneo di una cavia portò la morte in 24 ore con peritonite e pleurite fibrino purulenta e numerosi streptococchi negli essudati e nel sangue del cuore. Nel secondo caso (XIX), mentre lo streptococco isolato si mostrò pochissimo patogeno, per converso si isolò uno stafilococco piogene aureo che inoculato sotto cute in due cavie le uccise in 24 ore producendo un flemmone esteso a tutto l'addome ed al dorso. Ora in questi casi è dimostrata alla evidenza la importanza delle associazioni batteriche nella difterite e la causa di alcuni insuccessi della sieroterapia.

Ma se, come vedemmo, la morfologia del bacillo di Loeffler non ci serve come criterio pronostico della mitezza o della gravità del caso clinico, lo stesso possiamo dire, benchè in minime proporzioni del grado di tossicità dei prodotti del bacillo stesso. Ossia, avendo un bacillo che segrega prodotti tossici poco elevati non siamo autorizzati e dire che quel caso decorrerà mite e verso la guarigione; e viceversa avendo prodotti molto tossici non possiamo dedurne la gravezza della forma clinica. È così che vediamo nelle nostre esperienze che lo stesso grado di tossicità ci vien dato da bacilli isolati in forme miti ed in forme gravissime. P. es. la dose minima mortale di 0.005 ci è stata data da un caso mite terminato in guarigione (II), da due discretamente gravi ma

pure essi guariti (I-XXI) e da un caso gravissimo terminato colla morte (V). Così mentre abbiamo registrato un caso mite guarito rapidamente con 0.002 di tossicità, ne abbiamo uno gravissimo terminato da morte con solo 0.01. E di tali esempi se ne potrebbero riferire altri desumendoli dalla tabella sopra esposta. È questa ancora una prova che alla determinazione del quadro clinico della difterite non concorre soltanto il bacillo di Loeffler, ma oltre alle associazioni batteriche sopra ricordate vi concorre anche il grado di resistenza individuale dell'organismo.

L'esame batteriologico che, nella difterite specialmente, ha assunto una importanza così notevole tanto da non potersene giammai esimere nello studio di ogni singolo caso, non deve per conseguenza far dimenticare la clinica, perchè in ogni caso speciale la forma clinica, l'andamento della malattia, il suo esito, il rispondere o no alla cura specifica, dipendono da una quantità e da un insieme di fattori che le ricerche di laboratorio non ci possono completamente rivelare. Però dobbiamo dire che nella maggior parte dei casi le indagini batteriologiche si fanno troppo superficialmente. Non basta svelare la presenza del bacillo di Loeffler. Bisogna studiarne la virulenza ed il grado di tossicità dei suoi prodotti. Bisogna studiare, non solo limitandosi a constatarne la presenza, ma vedere quale e quanto potere patogeno abbiano tutti e singoli gli altri microrganismi che a quello di Loeffler si trovano associati. E queste ricerche in ogni caso dovrebbero ripetersi nel corso della malattia anche parecchie volte, ed anche ad esito avvenuto o colla morte o colla guarigione. E sarebbe desiderabile che questo studio potesse completarsi colla ricerca del potere antitossico del siero sanguigno nei vari periodi della malattia (cosa non facile nella pratica trattandosi di bambini). In questo modo, e solo in questo modo, la batteriologia potrebbe rendere i più grandi servigi alla clinica, e potrebbesi così rendersi ragione di una quantità di modalità, e di fatti apparentemente contradittori ed in parte inesplicati, che tutto giorno si incontrano nella pratica, compresi molti così detti insuccessi della sieroterapia. Ci auguriamo che questo piccolo nostro contributo valga a dilucidare alcuni di questi fatti, o per lo meno valga a spronare su questa via gli studiosi per ricerche più accurate o più complete.

Roma, 1898 — Tip. Elzeviriana.